

ショウジョウバエ脳における神経伝達物質受容体の網羅的可視化と発現解析

著者	高橋 貴裕
号	17
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	生博第394号
URL	http://hdl.handle.net/10097/00127800

東北大学第64号

博士論文内容の要旨及び 審査結果の要旨

生命科学第17集（課程博士）

（令和元年度授与）

東 北 大 学

令 和 元 年 度

氏名	たかはし たかひろ		
学 位 の 種 類	高橋 貴裕		
学 位 記 番 号	博士（生命科学）		
学位授与年月日	生博第394号		
学位授与の要件	令和2年3月25日		
研 究 科 , 専 攻	学位規則第4条第1項該当		
論 文 題 目	東北大学大学院生命科学研究科		
博士論文審査委員	(博士課程) 生命機能科学専攻		
	ショウジョウバエ脳における神経伝達物質受容体の網羅的可視化と発現解析		
	(主査)	教授	谷本 拓
		教授	杉本 亜砂子
		助教	梅津 大輝

論文内容の要旨

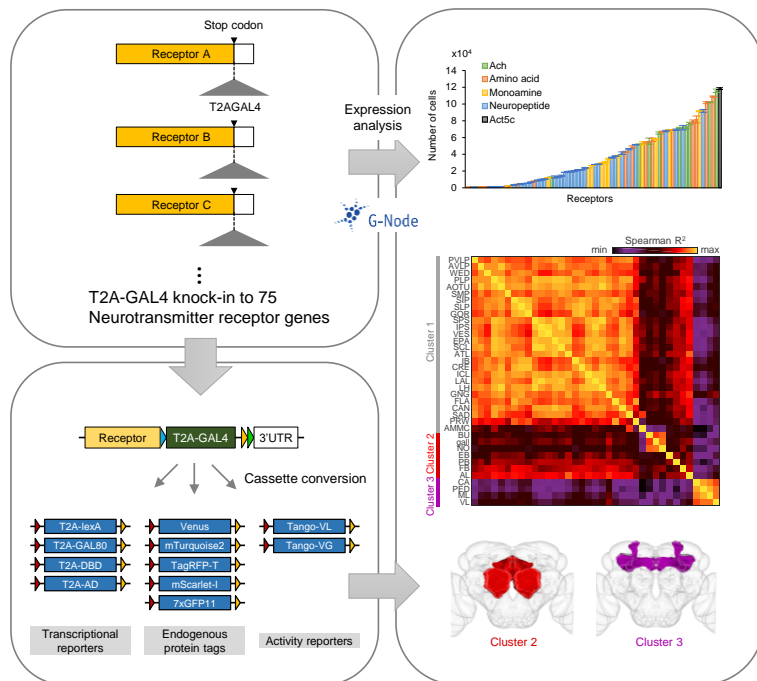
【背景】

神経科学の主要な目的のひとつは、情報処理における神経ネットワークの基盤原理を理解することである。近年の組織イメージング技術と電子顕微鏡の発達により、今までにない解像度で全脳レベルにおける神経の投射とシナプス接続の再現が可能となった。しかしながら、神経接続の記述のみでは回路においてどのように情報が処理されるのかを理解するには不十分であり、神経伝達物質とその受容体の

知見が不可欠である。100 種を超える神経伝達物質がこれまでに同定されており、それぞれ固有の細胞効果と有効範囲を持っている (Hyman, 2005)。さらに複雑なのは、多くの神経伝達物質が複数の同系受容体を持っていることである。In vitro において、一部の受容体の分子的特性はよく調べられているが、全脳レベルにおける発現と機能についてはあまり多くは知られておらず、受容体多様性の意義は明らかにされていない。ここで、ショウジョウバエ *Drosophila melanogaster* の脳は、容積が小さく、神経伝達メカニズムが進化的に保存されていることに加え (Yoshihara et al., 2001)、使用できる遺伝学的ツールの種類が豊富であるため (del Valle Rodriguez et al., 2011; Venken et al., 2011b)、理想のモデルシステムであると言える。我々は、本研究のために新たに作製した C 末端特異のカセット挿入による受容体 2A-GAL4 系統を用いて、全受容体の発現データベースの作成と受容体多様性の意義に踏み込むことを試みた。

【方法】

受容体 2A-GAL4 系統を用いた受容体発現の体系的にプロファイリングするため、histone-RFP によって可視化された発現細胞核数の自動定量化パイプラインの確立、および mCD8::GFP によって可視化された投射パターンをサンプル間で相互比較・解析するための brp-SNAP シグナルをランドマークとしたレジストレーションの最適化をまず行った。伝達物質受容体発現細胞の核と投射パターンの可視化のため、各 2A-GAL4 系統と $w; su(Hw)attP5\{10XUAS-IVS-myr::GFP\}; UAS-His-RFP$ 、または $w; TI\{TI\}brpSNAP^{F-tag}; attP2\{20XUAS-IVS-mCD8::GFP\}$ をそれぞれ交雑した。摘出した脳は共焦点レーザー顕微鏡を用い、全脳を三次元的にスキャンした。得られた his-RFP 発現データから、各 2A-GAL4 系統の発現細胞数を定量化した。また得られた mCD8::GFP データは全て IS2 標準脳 (Cachero et al., 2010) へのレジストレーションを行った。Hierarchical nomenclature system (Ito et al., 2014) に基づくニューロピルごとの平均発現強度を算出し、



得られたデータを python および Matlab スクリプトを用いてクラスタ解析した。

【結果】

His::RFP チャンネルを用いた細胞数自動カウントパイプラインの確立によって、高精度かつ短時間で任意の GAL4 系統の全脳発現細胞数を定量化することが可能となった。ベンチマークとして行った全脳細胞数と全グリア細胞数は、先行研究によって報告されている数値と非常に近似していることが確かめられた。本パイプラインと受容体 2A-GAL4 系統を用いて、ショウジョウバエゲノムで確認されている 113 種の神経伝達物質受容体のうち 75 種の全脳発現細胞数の定量化を行った。その結果、受容体によって脳内発現細胞数がほぼ皆無のものからほぼ全脳細胞に発現しているものに至るまで多様であることが確かめられた。また定量解析によって、ひとつの脳細胞あたり平均で 30 % (75 遺伝子のうち 22 遺伝子) の神経伝達物質受容体を共発現していることが示唆された。また興味深いことに、イオンチャンネル型受容体は代謝型受容体と比較して細胞数に二極的な分布があることが明らかとなった。すなわち多数の脳内細胞において発現しているものとほとんど発現していないものに分類された。

これとは別に brp::SNAP; UAS-mCD8::GFP 系統を用いて、標準脳上に全 2A-GAL4 系統の投射パターンをレジストレーションした受容体発現データベースを作製した。ここで同一のリガンドに対する受容体において非常に近似した発現パターンを持つものと大きく異なる発現パターンを示すものが存在することを確認した。さらに脳領域ごとの受容体発現プロファイルを、スペクトラルクラスタリングを用いて解析した結果、これらの領域が三つの「機能的」構造に分類できることを突き止めた。

【考察】

受容体 2A-GAL4 系統の網羅的コレクションによって、高解像度かつ全脳レベルでの神経伝達物質受容体の内在発現プロファイリングを行うことに成功した。細胞数カウントの結果から、単一細胞あたり少なくとも平均 22 の受容体を共発現していることが示唆された。このように受容体を複合的に発現させることで、外部からの入力に対する細胞応答の多様化を可能にしていると考えられる。本研究の結果、脳全体を通して神経伝達物質受容体の発現パターンは極めて複雑であることが明らかとなった。解析の結果から、同じリガンド分子や同じリガンド種に対する受容体は近似した発現パターンを示すことが明らかとなった。同一ニューロンにおいて発現する特定の受容体は、ヘテロダイマーを形成し異なる G タンパク質を共役することによって、あるいは異なる特性のイオンチャンネルを形成することによって、共役して機能する可能性がある (Jordan and Devi, 1999)。これらの受容体複合体の特殊な機能は細胞応答におけるさらなる多様性に貢献し、これによって神経回路の計算能力を増幅させうると考えられる。

さらにニューロピルのクラスタ解析によって、キノコ体と中心複合体を構成するニューロピルは残りの脳領域から際立って異なっていることが明らかとなった。キノコ体と中心複合体はいずれも周辺の神経系との明確な接続を持っておらず、脳の高次元統合中枢とみなされている (Vogt et al., 2015; Namiki et al., 2018)。この 2 つの中枢における受容体の特徴的な組み合わせが情報統合における多様な情報処理プロセスの基礎を築いているものと推測される。

論文審査結果の要旨

神経回路の機能は、神経伝達物質による細胞間の連絡により発現されるが、神経伝達物質の多くは対応する受容体を複数持つことが知られている。しかし、なぜひとつの神経伝達物質に複数の受容体が反応するのか、受容体分布の構成とその多様性の生物学的意義は十分に理解されていない。従来の神経伝達物質の研究では、細胞単位での解析が盛んに行われてきた反面、回路や脳領域レベルにおける構成の網羅的分析がなされた例は少ない。多様な受容体の生体内での機能を知るためには、その受容体の発現パターンや細胞内局在、活性化した受容体の分布を可視化し、体系的に比較する必要がある。

本研究は、75種の神経伝達物質の受容体遺伝子についてマーカー遺伝子のノックインショウジョウバエ系統を作成し、網羅的に各伝達物質を受容する細胞の形態学的解析を行ったものである。内在性遺伝子と同じパターンでトランスジーンを発現するトランスジェニックライブラリーは国立遺伝学研究所・近藤周博士により作成されたものを用いた。脳内発現を網羅的に可視化することで、ショウジョウバエ脳の神経伝達物質受容体マップを構築した。さらに、多次元数理解析を通じて各受容体間や脳領域間の類似性を定量し、神経回路の構成原理の一端を明らかにした。

本研究は、ショウジョウバエのモデル生物としての利点を生かした網羅的かつ組織中での遺伝子発現解析である点が独創的である。これは、電気生理、薬理学的な手法で個々の細胞や分子メカニズムに焦点を当てた従来型の研究とは一線を画する。また受容体発現による脳領域の分類などは、全脳解析という手法の利点を活かしたもので、近年急速に発展している単一細胞 RNAseq 解析などでも達成することはできない。高橋氏は、網羅的顕微鏡データ取得、大規模な画像処理技術の開発、画像データベースの作成、脳の構造解析を独自に行ったという意味で、優れた博士論文研究であると評価できる。

このような本研究の技術的な側面に対する評価は、論文審査、最終試験を通し一貫して高かった。一方で、既存研究との比較や研究アプローチの優位性についての把握、解釈の理解が深まると学位の質も改善されるとの指摘も受けた。

以上の結果をまとめると、高橋貴裕氏が自立して研究活動を行うに必要な高度の研究能力と学識を有することを示しており、最終試験も全員一致で合格とし、博士課程後期の修了を認めるに至った。したがって、高橋貴裕氏提出の論文は、博士（生命科学）の博士論文として合格と認める。